

機関番号：16401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590402

研究課題名 (和文) レチノイン酸代謝酵素 CYP26A1 は、癌治療の新しい標的となり得るか？

研究課題名 (英文) Retinoic acid metabolizing enzyme CYP26A1 is a candidate oncogene, and a possible therapeutic target for cancers.

研究代表者

小山内 誠 (OSANA I MAKOTO)

高知大学・教育研究部・医療学系・准教授

研究者番号：60381266

研究成果の概要 (和文)：ビタミン A 欠乏と癌化の関連性は疫学的に古くから指摘されているが、その分子機構の詳細は不明である。レチノイン酸はビタミン A の生理活性体であり、その代謝酵素である CYP26A1 は、乳癌をはじめとする広範な癌組織で高発現が見られ、CYP26A1 の過剰発現に伴う腫瘍内微小環境でのレチノイン酸不足は、腫瘍細胞の悪性形質の獲得と密接に関連する。我々は、CYP26A1 が新規の癌遺伝子であることを証明し、CYP26A1 を分子標的とする創薬研究の基盤的情報を得た。

研究成果の概要 (英文)：Vitamin A deficiency (VAD) is associated with increased susceptibility to carcinogenesis in animal models and elevated risk for a number of human cancers. We found that the CYP26A1, the gene encoding a cytochrome P450 enzyme specifically involved in metabolic inactivation of retinoic acid (RA), the most active vitamin A derivative, is highly expressed in a number of variety types of cancer, including primary breast carcinomas. We also found that the state of reduced RA bioavailability caused by enhanced expression of CYP26A1 is sufficient to markedly increase tumorigenic and metastatic potential. Our observations provide strong evidence for oncogenic and cell survival properties of CYP26A1 in carcinogenesis, and suggest mechanisms whereby VAD might promote cancer development. We believe that specific drug-mediated inactivation of CYP26A1 may have a notable impact on malignant potential of human tumors, and these results show its potential feasibility of CYP26A1-inhibitory cancer therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍・発癌・レチノイン酸・ビタミン A・癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ビタミン A 欠乏と癌化の関連性は疫学的に古くから指摘されているが、その分子機構の詳細は不明である。ビタミン A の生理活性体

であるレチノイン酸は、細胞の増殖、分化、形態形成などの基本的生命現象を特異的に制御する内因性物質である。特に、レチノイン酸は種々の癌細胞に対しアポトーシスを

誘導し、発癌過程を抑制する。癌細胞では、一般にアポトーシスシグナルと生存シグナルの不均衡が存在するが、アポトーシス感受性の低下は、癌をはじめとする病的状態と直結する細胞機能異常である。我々は、予備実験から、レチノイン酸代謝酵素である CYP26A1 の発現亢進に伴う細胞内のレチノイン酸量の減少が、癌細胞のアポトーシス感受性を著明に低下させる分子機構を解明した。この成果により、レチノイン酸の生物学的効果は、全身性の血中レチノイン酸量より個々の細胞レベルでの絶対量に依存するとの考えに基づく新規の概念を提出し、レチノイン酸の細胞内での減少が直接発癌に関与する可能性を示唆した。

2. 研究の目的

我々は、腫瘍内微小環境でのレチノイン酸不足は、癌細胞自身が非調節性に高発現する CYP26A1 が原因と考える。一方、ビタミン A 欠乏と癌化の関連性は、疫学的に古くから指摘されているが、発癌に関する分子生物学的機構の解明は十分ではない。そこで本研究では、以下の点に着目し研究を推進する。

- (1) 細胞単位でのレチノイン酸欠乏と腫瘍細胞の悪性形質獲得の機能的関連性
- (2) 細胞内レチノイン酸量を減少させる CYP26A1 の非調節性高発現の分子機構
- (3) CYP26A1 を分子標的とする全く新しい癌治療法の開発

3. 研究の方法

- (1) 細胞レベルでの CYP26A1 の発現異常が、直接的に発癌に関与するか？
 - (2) レチノイン酸依存性の転写機構を標的とした治療手段の開発は可能か？
- 本研究は、以上の作業仮説を解決することを目的とした。

腫瘍細胞およびヒト腫瘍組織における CYP26A1 の発現様式の解析

広範な細胞種および種々の癌組織で、CYP26A1 の系統的な発現様式を検討する。CYP26A1 の発現パターンと予後との間に正の相関が見られることが期待される。

各種培養細胞を用いた CYP26A1 の機能的役割の解析

複数の癌細胞で CYP26A1 の高発現株を樹立し、抗癌剤などで刺激されるアポトーシス感受性、および足場依存性アポトーシスであるアノキス感受性の差を検討する。また、2次元および3次元培養下におけるコロニー形成能、マウス同種移植の系を用いた *in vivo* での腫瘍増殖能、および肺への転移性を検討する。CYP26A1 の発現ベクターは、野生型とともに数個の欠損体は既に作製済みであり、

CYP26A1 の機能発現に重要な遺伝子領域の同定を試みる。これは、阻害剤開発に直結する重要な知見となる。

CYP26A1 の発現制御における調節的な分子機構の解明

薬理的濃度のレチノイン酸で誘導される内因性 CYP26A1 の発現調節機構の解明のため、CYP26A1 プロモーターの機能評価を行う。プロモーター研究は、CYP26A1 の過剰発現の分子機構の理解および解明に必須である

癌細胞における CYP26A1 高発現に関与するシグナル伝達系の解析

レチノイン酸は、PKC、PI3K、ERK、JNK などの複数の細胞内シグナルと関連するため、CYP26A1 による癌細胞の形質変化に伴う分子機構の網羅的な解明にむけ、マイクロアレイ技術を利用する。

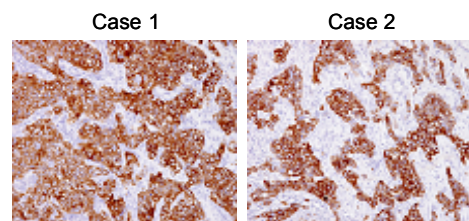
CYP26A1 を分子標的とする新しい癌治療法の開発に向けた基盤的研究

細胞内で、レチノイン酸を効率よく核内転写機構に到達させるには、理論上、(1) 生体内で代謝されない、即ち CYP26A1 耐性のレチノイン酸を用いる、(2) CYP26A1 の特異的阻害剤を用いる、の2つの基本方針が想定される。CYP26A1 に耐性なレチノイン酸は、影近弘之教授 (東京医科歯科大学大学院、疾患生命科学部)より供与を受けている。一方、CYP26A1 蛋白質の三次元構築から想定される特異的酵素阻害剤をスクリーニングし、CYP26A1 に特異的な阻害剤の開発を目指す。

4. 研究成果

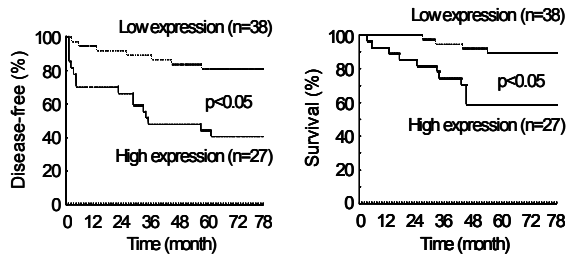
異なる複数のアッセイ系を利用し、以下の研究成果を得た。

CYP26A1 は種々の癌組織で高発現している
CYP26A1 が多彩な癌細胞で高発現していることを、RT-PCR 法およびウェスタン法を用いて確認した。さらに、ヒト腫瘍組織を用いて検討したところ、約 45%の症例に過剰発現が見られ、一般検査室で検出容易な免疫染色法でも確認可能であった。以下は、乳癌組織を用いた代表的な染色結果であり、容易に陽性反応を確認可能である。



次に、ヒト乳癌の手術標本を染色し、臨床像との相関を検討したところ、CYP26A1 の高発

現は無病期間（下図、左）および生存期間（下図、右）と有意な相関性を有した。



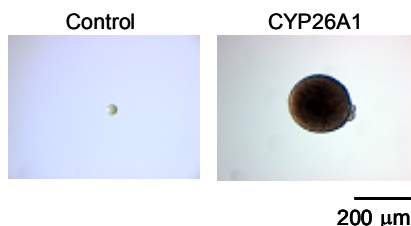
CYP26A1 の高発現により癌細胞はアポトーシス抵抗性となる

- (1) CYP26A1 の機能分析のため、複数の異なる乳癌細胞株に遺伝子導入を行ったところ、酸化ストレス、抗癌剤、放射線、低栄養状態など細胞死を惹起し得る全ての因子によるアポトーシス感受性の低下がみられた。
- (2) アノイキスは足場依存性のアポトーシス反応であり、アノイキス耐性形質は発癌過程の進行に重要である。上記と同様に、CYP26A1 の高発現は、腫瘍細胞にアノイキス反応に対する高度の耐性を与えた。
- (3) 逆に、内因性に CYP26A1 を高発現する乳癌細胞株に siRNA 法にてその発現抑制を行った場合、アポトーシス感受性が増幅した。
- (4) CYP26A1 の欠損体である cDNA を作製し遺伝子上の責任領域の同定を試みたところ、アポトーシス感受性の修飾には、レチノイン酸分解領域が重要であり、欠損体固有のレチノイン酸分解能とアポトーシス感受性は有意な負の相関性を示した。

したがって、CYP26A1 による細胞内レチノイン酸量の減少が、直接的にアポトーシスおよびアノイキス感受性の低下を惹起している証拠を得た。

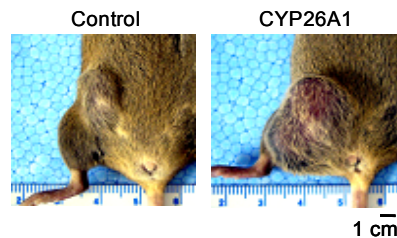
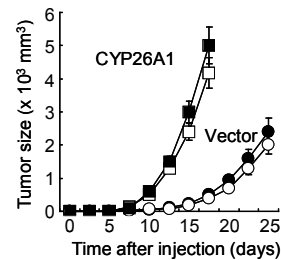
CYP26A1 の高発現により高度の足場非依存性増殖能を得る

足場非依存性の増殖は、癌の進行過程で重要であり、CYP26A1 の高発現細胞株を培養器具に非接触状態で培養することにより評価が可能である。アノイキス耐性の結果と一致し、本実験では CYP26A1 が有意に足場非依存性増殖能を亢進するとの結果を得た。下記は代表的結果であり、CYP26A1 の高発現により大きなコロニーを形成した。



CYP26A1 の高発現は癌の増殖を促進し、肺への転移能を促進する

さらなる機能評価のため、マウス同種移植の系を用いた *in vivo* の腫瘍増殖能を測定した。試験管内実験と同様に、CYP26A1 の過剰発現はマウスの乳腺内で腫瘍増殖を促進し、大きな腫瘍を形成した（下図：上は増殖曲線；下はマウス乳腺に形成された腫瘍）。さらに、CYP26A1 の高発現は肺への転移能を有意に亢進し、CYP26A1 が直接的に腫瘍の進展に関与する客観的証拠を得た。



CYP26A1 は広範な相互に独立したシグナル伝達系を制御する

CYP26A1 による癌細胞の形質変化に伴う分子機構の網羅的な解明にむけ、マイクロアレイ技術を利用した。レチノイン酸は莫大な遺伝子の直接的な発現制御を行うが、CYP26A1 の高発現により多彩なシグナル伝達系が修飾されることが判明した。これらの変化は、腫瘍の進展と密接に関連し、発癌過程において腫瘍細胞の悪性度の進展に重要な役割を有することが確認できた。さらに、細胞内シグナルの特異的阻害剤を用いた実験では、MAPK 系シグナルと CYP26A1 シグナルのクロストークが観察された。

CYP26A1 の発現制御の基盤としてレチノイン酸が必須である

- (1) CYP26A1 の発現制御の理解は、非制御性に高発現している癌細胞の機能修飾に重要である。CYP26A1 の発現を直接的に制御している CYP26A1 プロモーター領域の解析から、CYP26A1 の発現に生理的かつ薬理的濃度のレチノイン酸が必須であり、細胞内での恒常的発現のみならず、レチノイン酸によって誘導される CYP26A1 の高発現にも影響する。
- (2) ニコチンはタバコに含まれる中毒性物質であり、発癌物質とは異なる視点から乳癌との関連が議論されてきた。今まで、ニコチンが乳癌の進展を促進する、あるいは抑制する

との相反する報告が混在し、一定の見解はなかった。しかし、我々は、ニコチンが、mRNA レベルで CYP26A1 の発現を抑制し、結果的に乳癌細胞の悪性形質の抑制に関与することを証明した。動物実験でも、乳癌の進展を有意に抑制する旨の客観的結果を得た。本知見は、ニコチンあるいは喫煙と乳癌の進展の関連性を理解するうえで重要である。

(3) 日光に由来する紫外線は、皮膚発癌を促進する。本知見は極めて一般的に知られているが、紫外線が、直接遺伝子を傷害する発症機構以外の分子機構の全貌は未だ不明である。我々は、皮膚癌の由来細胞として最も一般的な皮膚基底細胞において、紫外線照射が CYP26A1 の発現を有意に誘導することを見出し、前癌病変である日光角化症で CYP26A1 の高発現を高率に観察した。本実験から、紫外線照射と皮膚発癌の機能的関連性を、レチノイン酸代謝という観点から明らかにした。

レチノイン酸代謝に対する耐性化学物質は CYP26A1 を高発現する癌細胞にアポトーシス感受性を与える

CYP26A1 を分子標的とする新しい治療法の開発に向け、理論的に2ヶ所の薬理的標的を候補に挙げた。即ち、(1) CYP26A1 の直接的な阻害剤、および、(2) CYP26A1 に耐性なレチノイン酸である。前者は、既存の特許権に違反せず、かつ第三者が安全に入手できる物質には強い社会的な制限が存在するため、実験での利用を断念した。後者は、研究協力者である影近弘之教授(東京医科歯科大学大学院、疾患生命科学研究所)より供与を受け、実際の実験に使用することができた。その結果、我々の作業仮説通り、CYP26A1 耐性レチノイン酸は、CYP26A1 を過剰発現している乳癌細胞株に対し、強いアポトーシス感受性を与えることができた。さらに、マウス乳腺への移植モデルでも、癌細胞の増殖に有意な抑制効果を認めた。これらは、我々の概念の理論的な妥当性を直接的に証明し得る研究成果と考える。

本研究課題の総括

レチノイン酸の多彩な生物学的効果を反映し、多岐にわたるアッセイ系を利用することにより、CYP26A1 の機能に関する新規の重要な知見を得た。本研究課題から、CYP26A1 が新規の癌遺伝子であることを明瞭に証明できた。これらは、CYP26A1 を標的とする創薬研究に対する重要な基盤的情報となり、CYP26A1 の特異的阻害剤は全く新しい抗癌剤の開発に寄与する。今後、具体的な治療法の開発に向けた研究の強力な推進が必須と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Osanai M, Sawada N, Lee GH. Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1. *Oncogene*, 29:1135-1144, 2010. 査読有.
2. Osanai M, Lee GH, Sawada N. Emerging novel treatment strategies for diabetic eye diseases. *Current Diabetic Reviews*, 6: 35-41, 2010. 査読有.
3. Yamasaki K, Hayashi Y, Okamoto S, Osanai M, Lee GH. Insulin-independent promotion of chemically induced hepatocellular tumor development in genetically diabetic mice. *Cancer Sci*, 101: 65-72, 2010. 査読有.
4. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 588-600, 2008. 査読有.
5. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Inatomi S, Ohguro H, Sawada N. Experimental effect of retinoic acids on apoptosis during the development of diabetic retinopathy. *Clinical Ophthalmol*, 2: 233-235, 2008. 査読有.
6. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell*, 19: 1912-1921, 2008. 査読有.
7. Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee GH. Expression of fascin-1, an actin-binding protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. *Cell Tissue Res*, 334: 219-226, 2008. 査読有.
8. Hatakeyama N, Kojima T, Iba K, Murata M, Thi MM, Spray DC, Osanai M, Chiba H, Ishiai S, Yamashita T, Sawada N. IGF-I regulates tight-junction protein claudin-1 during differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells via a MAP-kinase pathway. *Cell Tissue Res*, 2008; 334: 243-254. 査読有.
9. Kojima T, Takano K, Yamaguchi H, Murata M, Son S, Imamura M, Yamaguchi H, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Transforming growth factor-beta induces epithelial to

mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. *Liver Int*, 2008; 28: 534-545. 査読有.

10. Koizumi J, Kojima T, Ogasawara N, Murata M, kamekura R, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Protein kinase C enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. *Mol Pharmacol*, 74: 432-442, 2008. 査読有.

[図書] (計 2 件)

1. Osanai M. Springer. The tight junction, intercellular seal as a cell-signaling player - Protocols for examination for its status. *Claudins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Turksen K (Ed.), 2010, 20.
2. Osanai M. Springer. Tight junctions. *Encyclopedia of Cancer*, Second edition. Schwab M (Ed.), 2009, 4.

[学会発表] (計 2 件)

1. 小山内 誠、李 康弘：レチノイン酸代謝酵素 CYP26A1 は乳癌で高発現している。日本病理学会総会・2010年4月28日・東京。
2. Makoto Osanai, Gang-Hong Lee: Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1. : 小山内 誠、李 康弘：レチノイン酸代謝酵素 CYP26A1 の癌遺伝子としての役割。日本癌学会総会・2010年9月23日・大阪。

[その他]

研究室のホームページ

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_ptl12/index.htm.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山内 誠 (OSANAI MAKOTO)

高知大学・教育研究部・医療学系・准教授

研究者番号：60381266

(2) 連携研究者

李 康弘 (LEE GANG-HONG)

高知大学・教育研究部・医療学系・教授

研究者番号：10261405